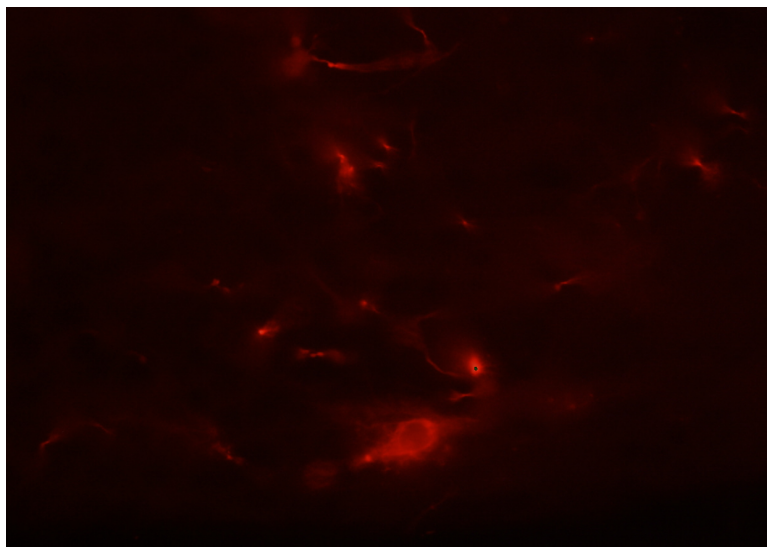


Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Celular

Estudio experimental de las conexiones del sistema gustativo en la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*).

Estudo experimental das conexións do sistema gustativo no melgacho (*Scyliorhinus canicula*).

Experimental study of the gustatory system connections in the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*).



Laura Rodríguez Díaz

Trabajo de fin de grado

Fecha de defensa: 29 de junio de 2015

Dirigido por el Dr. Julián Yáñez Sánchez

ÍNDICE

Resumen / Abstract.....	5
1. Introducción.....	6
2. Objetivos.....	8
3. Material y métodos.....	9
4. Resultados.....	11
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones / Conclusions.....	20
7. Agradecimientos.....	21
8. Bibliografía.....	21

RESUMEN

El sistema gustativo central ha sido muy estudiado en ciertos grupos de teleósteos como ciprínidos e ictalúridos, sin embargo es prácticamente desconocido en elasmobranquios. Con la intención de esclarecer cuáles son los principales centros de integración de la información gustativa y visceral y cuáles son las proyecciones eferentes de dichos centros en peces cartilaginosos, en el presente estudio se tomó como representante al tiburón pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), en el que se realizaron experimentos de trazado neuronal con la carbocianina lipofílica Dil. Nuestros resultados mostraron unas pocas proyecciones eferentes que viajan a lo largo de un tracto ascendente: el tracto gustativo secundario, que termina a nivel del istmo. Se ha inferido la localización de un supuesto núcleo gustatorio secundario mediante sus proyecciones hipotalámicas. La escasez de neuronas en el núcleo gustatorio secundario sugiere que los elasmobranquios poseen un sistema gustativo reducido comparado con la mayoría de peces teleósteos.

ABSTRACT

The central gustatory system has been widely studied in some teleostean groups such as cyprinids and ictalurids, however this system is mostly unknown in elasmobranchs. With the aim of describing the main gustative and visceral integration centers and its afferent projections in cartilaginous fish in the present study we have chosen the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) as a representative species for this group, in which we carried out tract-tracing experiments using the lipophilic carbocyanine dye Dil. Our results showed a few efferent projections from the primary centers, coursing along an ascending tract, the secondary gustatory tract, that ends at the isthmal level. The location of the putative secondary gustatory nucleus was also inferred by its hypothalamic projection. The scarcity of neurons in the secondary gustatory nucleus suggests that elasmobranchs possess a reduced gustatory system compared to most teleostean fish.

1. INTRODUCCIÓN

Scyliorhinus canicula, también conocido como tiburón pintarroja, es una especie del orden de los carcarriniformes que tomaremos como representante para estudiar las conexiones neuronales del sistema gustativo de los condríctios.

Esta especie es relativamente común en Galicia y gran parte del mediterráneo, siendo uno de los peces elasmobranquios más abundantes en el noroeste del atlántico. Se caracteriza por tener la piel de color grisáceo con manchas oscuras y por su pequeño tamaño, ya que rara vez alcanza los 100cm. Además es bastante popular en acuariofilia y cría bien en cautividad siendo totalmente inofensivo para el hombre (Ellis et al., 2014). Esta especie está siendo ampliamente utilizada para investigación como representante de los peces cartilaginosos por lo que existen numerosos estudios sobre su neuroanatomía y su desarrollo embrional. Todas estas características hacen del tiburón pintarroja una especie idónea como modelo para el presente trabajo.

Hasta hace poco, los peces cartilaginosos se consideraban organismos “primitivos” en el sentido de simples o poco evolucionados, sin embargo entre otras consideraciones desde el punto de vista neuroanatómico poseen encéfalos relativamente grandes con sistemas sensoriales complejos. Algunas investigaciones muestran que la proporción del peso del cerebro en relación al cuerpo de algunos elasmobranquios es comparable a aquella de aves o mamíferos y se ha demostrado que bioquímicamente, el encéfalo de los tiburones es mucho más cercano al de amniotas que al de anamniotas como cabría esperar. Tradicionalmente el tamaño del encéfalo se ha relacionado con la complejidad del comportamiento pero es difícil hacer esta suposición en tiburones ya que no existen suficientes estudios al respecto (Smeets, 1998).

Como en la mayoría de los tiburones, el encéfalo de *Scyliorhinus* se encuentra casi herméticamente cerrado en el neurocráneo y es relativamente grande y bien desarrollado originándose como en todos los vertebrados a partir de tres vesículas primarias: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. El prosencéfalo originará el prosencéfalo secundario, donde se incluye la región conocida tradicionalmente como telencéfalo que da lugar a los dos hemisferios cerebrales, al área preóptica y a la mayor parte del hipotálamo clásico, y el prosencéfalo secundario que da lugar al pretálamo, tálamo y pretecho, incluyendo partes del hipotálamo. El mesencéfalo da lugar al techo óptico mientras que del rombencéfalo se diferencia en cerebelo y bulbo raquídeo.

Existen muchas evidencias tanto anecdóticas como experimentales de la importancia de las percepciones sensitivas químicas en los elasmobranquios, particularmente del olfato, mediado por células receptoras del epitelio olfativo que participa no solo en la detección y localización del alimento sino en comportamientos reproductivos y sociales, pero también del gusto, que por otra parte, se origina en la cavidad bucal y orofaríngea, y se limita a funciones de localización de comida e ingestión (Smeets, 1998). Tradicionalmente, el olfato se ha definido como un sistema quimiosensorial que detecta ciertas moléculas a larga distancia, mientras que el gusto sólo lo hace por contacto, sin embargo en los peces, ambos sistemas funcionan a larga distancia debido a que las moléculas están disueltas en el agua y pueden responder a los mismos estímulos químicos, por lo que parece darse cierto

solapamiento entre ellos (Evans et al., 1998). Ambos sistemas están bien estudiados en ciertos grupos de teleósteos como ciprínidos e ictalúridos, cuya evolución ha llevado a un notable desarrollo del sistema gustativo y como consecuencia a una hipertrofia de los centros nerviosos que integran la información de este sistema, por lo que comúnmente se han tomado como modelo para su estudio y comparación con el de otras especies (Kanwal & Finger, 1992), en otros grupos como los salmónidos (Folgueira et al. 2003) y las lampreas (Barreiro-iglesias et al., 2010) el sistema gustativo ha sido recientemente estudiado, sin embargo, poco se sabe de estos mecanismos en tiburones.

Las papilas gustativas están presentes en todos los vertebrados estudiados hasta ahora, desde lampreas a mamíferos. Estos órganos son agregados de células gustativas de morfologías y tipos funcionales diferentes, que se extienden desde una lámina basal hasta un poro apical abierto en el epitelio. Las papilas captan señales químicas y envían esta información a fibras aferentes de tres nervios craneales; el facial (VII), el glosofaríngeo (IX) y el vago (X) (Kirino et al., 2013). Algunas de las células gustativas derivan del ectodermo mientras que otras lo hacen del endodermo, por lo que las fibras gustativas son clasificadas como somáticas (VII) o viscerales respectivamente (IX, X) (Butler et al., 2005). En los tiburones, las papilas gustativas que parecen tener una morfología similar a las de teleósteos, se encuentran en el epitelio dispersas por la cavidad orofaríngea, branquias y válvulas orales, lo que sugiere que el mordisco y la manipulación de la presa con la boca son importantes para la distinción del gusto. Aparentemente, los elasmobranquios tienen menor densidad de papilas gustativas que los teleósteos pero esto no tiene por qué implicar un escaso sentido del gusto (Hart & Collin, 2015).

Los nervios VII, IX y X, contribuyen con fibras aferentes a los centros primarios de integración de la información gustativa en la columna viscerosensorial, localizada dorsolateralmente a la columna visceromotora en el rombencéfalo. Dependiendo del grado de desarrollo del sistema gustatorio, esta región puede protruir hacia el ventrículo por lo que también se la denomina lóbulo viscerosensorial en algunos casos. En mamíferos se la conoce como núcleo solitario y se compone de dos divisiones, unidas a la altura de la entrada del nervio vago; la división rostral es reconocida ahora como un núcleo separado, el gustatorio, mientras que la división caudal es el componente visceral de la columna visceral aferente y recibe fibras de los nervios glosofaríngeo y vago que vienen de la región de la garganta y de las vísceras del cuerpo, como los sistemas digestivo y respiratorio. Aunque no esté implicada en el sistema del gusto, esta división caudal conduce axones que junto con la información gustativa afectan al comportamiento alimenticio (Butler et al., 2005).

El núcleo gustatorio primario tiene una organización somatotópica en la que los nervios gustativos de las distintas regiones del cráneo (y del cuerpo en aquellos animales con receptores gustativos en la piel) entran en el núcleo en el mismo orden en el que están localizados en el cuerpo, es decir, los axones de la parte más rostral de la boca entran en el núcleo más rostralmente (Butler et al., 2005).

La información que conducen las fibras aferentes primarias de los nervios VII, IX y X ha sido poco estudiada en elasmobranquios pero en otros vertebrados es claramente de tipo gustativa, además de aportar información sobre temperatura, dolor y presión. En teleósteos este lóbulo está dividido en una serie de sublóbulos que se corresponden con el número de arcos branquiales, en contraste con el de otros vertebrados (Smeets, 1998). Peces como los ciprínidos y los ictalúridos, que como ya se ha comentado tienen un sistema gustativo extremadamente desarrollado, sirven como guía para el estudio de las conexiones nerviosas

gustativas de otros vertebrados. En ciprínidos este centro gustatorio primario ha evolucionado para formar los lóbulos vagales en la parte caudal, que reciben las conexiones del nervio X y están compuestos por una serie de capas complejas de neuronas, que contactan específicamente con áreas concretas de la boca, mientras que los axones generales viscerales del X terminan en un núcleo visceral aferente separado. En ictalúridos, son los lóbulos faciales los que están hipertrofiados y se encuentran rostro-medialmente a los lóbulos vagales. Estos reciben los axones gustativos del nervio facial (VII) ventro-lateral y son mucho mas prominentes en aquellas especies que tienen receptores gustativos distribuidos por la piel (Butler et al., 2005). El nervio glossofaríngeo termina en una región dorsal medular entre el lóbulo facial y el vagal que no es distinguible como lóbulo separado. La hipertrofia del lóbulo vagal de los ciprínidos está correlacionada con el gran desarrollo del sistema intraoral de selección de alimento; por el contrario, el desarrollo del lóbulo facial de los ictalúridos implica una especialización del sistema extraoral importante en los procesos de búsqueda y detección de comida (Kanwal & Finger, 1992).

En la mayoría de las especies de teleósteos y elasmobranquios, los lóbulos faciales y vagales no están bien desarrollados y pueden ser continuos e incluso indistinguibles entre sí, por lo que hablamos de una columna viscerosensorial que puede protruir ligeramente del suelo del cuarto ventrículo (Kanwal & Finger, 1992).

En general, se ha descrito que el lóbulo vagal proyecta hacia un núcleo motor de la parte caudal del encéfalo que controla los músculos de la orofaringe y del órgano palatal, mientras que el facial proyecta hacia un núcleo situado en el borde de la médula espinal conocido como núcleo funicular espinotrigeminal que integra la información gustativa y táctil de la cabeza y el cuerpo. En peces, la información gustativa/visceral parte de las neuronas de los centros primarios (columna o lóbulos viscerosensoriales) que proyectan al núcleo o complejo gustatorio y/o visceral secundario localizado en el istmo rombencefálico (proyecciones secundarias) y que a su vez mandaría la información vagal y facial a centros gustatorios terciarios como el toro lateral y lóbulo inferior del hipotálamo respectivamente (proyecciones terciarias). Además, tanto en especies de teleósteos con sistema gustativo especializado (ciprínidos, ictalúridos) como generalistas (salmónidos), el núcleo gustatorio secundario también proyecta al llamado núcleo gustatorio terciario, que es un componente del complejo nuclear preglomerular, situado en la parte caudal del diencefalo, que conecta de la misma forma que el secundario con el toro lateral y el lóbulo inferior del hipotálamo. Estas dos estructuras tienen conexiones recíprocas y contactan con otro componente del complejo nuclear preglomerular llamado núcleo talámico posterior (Butler et al., 2005).

En este estudio se utilizarán marcadores de carbocianina para identificar las conexiones aferentes del sistema gustativo en la pintarroja y compararlas con aquellas de otras especies ya conocidas.

2. OBJETIVOS

1. Identificar mediante el marcaje con trazadores neuronales los principales centros de integración de la información gustativa y visceral en *Scyliorhinus canicula*.

2. Comparar los resultados obtenidos en *Scyliorhinus canicula* con otros correspondientes a otras especies de peces.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se han utilizado los encéfalos de 9 individuos juveniles de entre 10 y 15 cm de longitud total sin distinción de sexo de *Scyliorhinus canicula* obtenidos del Aquarium Finisterrae- Museos científicos de A Coruña.

Los ejemplares fueron profundamente anestesiados con metanosulfonato de tricaína 0,1% (MS-222, Sigma, St. Louis, MO) disuelto en agua de mar y fijados intravascularmente con paraformaldehído (SIGMA) diluido al 4% en tampón fosfato 0,1M a pH 7,4 (PB) y suplementado con 1% de ácido etilentetraaminoacético (EDTA, Sigma). En los primeros ejemplares se utilizó una formulación de PB específica para elasmobranquios suplementada con urea (1%) y abandonada posteriormente por ser el origen de severos artefactos que inutilizaron el experimento (ver discusión). Para la perfusión, los ejemplares se dispusieron sobre un sustrato compuesto de un elastómero (SYLGARD®). A continuación y bajo un estereomicroscopio se expuso el corazón y a través de una cánula se inyectó a través del ventrículo 10-20 ml de la solución fijadora fría en el torrente sanguíneo. Durante la perfusión, la sangre y el exceso de fijador drenan por la aurícula a la que previamente se la había practicado una pequeña incisión. Posteriormente, una vez extraídos del cráneo los encéfalos se mantuvieron en el mismo fijador en nevera a 4°C antes del proceso de marcado.

Se realizaron marcajes simples y dobles utilizando dos tipos de marcadores lipofílicos fluorescentes: DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato; DiI18(3), Molecular Probes-INVITROGEN) y DiO (3,3'-dioctadeciloxacarbocianina perclorato; DiOC18(3)). Estas moléculas de carbocianina lipofílicas se integran en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de la célula afectada y difunden lateralmente a lo largo de toda ella, revelando la localización y morfología tanto de los cuerpos neuronales como de sus prolongaciones. Por tanto, el marcaje de una zona particular del encéfalo nos permitirá analizar y localizar tanto la posición de las células (retrógradamente marcadas) que envían sus axones a dicha zona, como los trayectos y destinos de los axones (que transportan el marcador anterógradamente) de aquellos somas neuronales ubicados en la zona de marcaje.

Todos los marcajes se realizaron de forma manual con ayuda de una aguja entomológica enmangada. Se realizaron dos estrategias de marcaje dependiendo de la accesibilidad de la zona a marcar. Para los marcajes de estructuras accesibles externamente (en encéfalos fijados sin alterar, *in toto*) se insertó un pequeño cristal de carbocianina con ayuda de un alfiler entomológico (minucia 000) en la zona de interés y posteriormente se cubrió la zona con agarosa líquida (3% en PB) para evitar una vez solidificada la dispersión de los cristales del trazador. Los encéfalos marcados se incubaron en paraformaldehído al 4% durante tiempos variables en una estufa a 37°C. Para realizar los marcajes de zonas menos accesibles primero se incluyeron los encéfalos en agarosa al 3% formando un bloque para luego seccionarlo transversalmente desde un extremo hasta alcanzar la zona de interés en un vibratomo (Campden Instruments, UK). Para controlar la proximidad y localización final

de la zona de marcaje, ciertas secciones de 70-100 μm sin teñir o teñidas ligeramente con azul de toluidina se analizaron con ayuda de un microscopio óptico de campo claro. Una vez expuesta la zona de interés se procedió de la misma forma que en el caso anterior para la aplicación del trazador (Figura 1).

Al terminar el periodo de incubación se realizaron fotografías de los encéfalos con una cámara digital (Coolpix, Nikon) adaptada a una lupa binocular para dejar constancia del punto exacto de aplicación del trazador.

Para el estudio del sistema gustatorio de esta especie se han marcado diferentes partes del encéfalo y se ha dejado que el trazador liposoluble transporte durante tiempos variables reflejados en la Tabla 1.

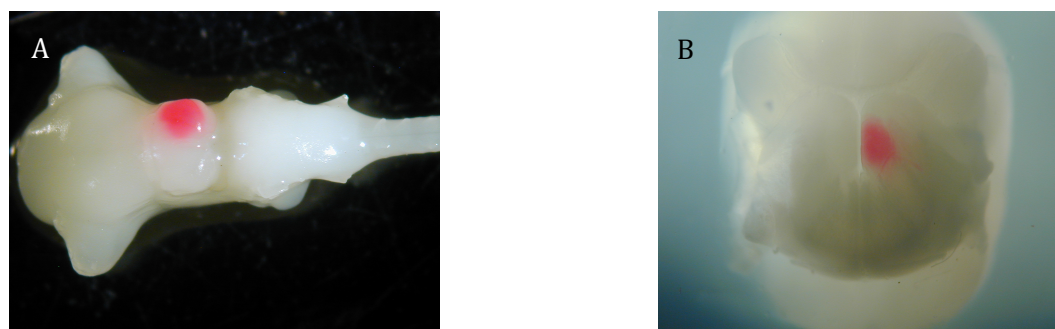


Figura 1. Ejemplo de marcaje. En la fotografía **A** se muestra marcado el lóbulo hipotalámico *in toto* con Dil. En la **B** se muestra un marcaje en el lóbulo visceral en un encéfalo incluido en agarosa y seccionado caudalmente.

Ejemplar	Tiempo de incubación	Zona marcaje
SC1	85 días	Lóbulo del X
SC2	88 días	Lóbulo del X
SC3	17 días	Lóbulo hipotalámico
SC4	28 días	Lóbulo del X
SC5	23 días	Lóbulo hipotalámico
SC6	33 días	Lóbulo del X
SC7	18 días	Lóbulo hipotalámico
SC8	24 días	Lóbulo del X
SC9	24 días	Región dorsal tegmental del istmo.

Tabla 1. Ejemplares utilizados, tiempo de incubación y zonas de marcaje.

Con los marcajes realizados en el lóbulo del X se pretendía esclarecer qué rutas toman los axones eferentes de este centro primario y dónde se encuentran sus terminaciones. El lóbulo hipotalámico se marcó con el objetivo de averiguar de dónde parten sus aferencias, para localizar el posible núcleo que proyecta hacia él y la región dorsal tegmental del istmo fue marcada en último lugar con la intención de marcar directamente el núcleo gustatorio secundario para observar células aferentes en los centros primarios.

Una vez transcurridos los tiempos de incubación indicados en la Tabla 1 todos los encéfalos fueron retirados del fijador y aquellos marcados *in toto* fueron incluidos en bloques de agarosa. Los bloques de agarosa fueron seccionados en el vibratomo realizando en esta ocasión secciones transversales entre 60 y 80 μm . Estas secciones se dispusieron sobre portaobjetos gelatinizados y montados con cubreobjetos con glicerina-PB 0'2M (1:1).

Las secciones se observaron con un fotomicroscopio de fluorescencia Nikon equipado con distintas combinaciones de filtros simples y dobles. Para la visualización del Dil se utilizó normalmente un filtro optimizado para Texas Red cuyo espectro de emisión y excitación es similar a la de este marcador (con un rango de excitación entre 562 y 640nm y de emisión de entre 624 y 640nm) mientras que para el DiO se utilizó un filtro optimizado para fluoresceína (FITC, rango de excitación entre 482 y 535nm y de emisión de entre 536 y 540nm). Ocasionalmente se utilizaron también filtros dobles GFP/DS-Red. Las fotografías de las preparaciones fueron tomadas con una cámara digital Olympus DPX-100 acoplada al microscopio. Las imágenes seleccionadas y los esquemas se editaron con el programa CorelDraw Graphics Suite®.

4. RESULTADOS

Todas las abreviaturas utilizadas han sido recopiladas en la Tabla 2.

Aplicación del Dil en el lóbulo vago

Dos de los marcajes fueron realizados en encéfalos *in toto* pero en el primero de ellos la aparición de estructuras microcristalinas globulares producto de la incubación en fijador con una de las soluciones tamponadoras (ver discusión) impidió la observación de las estructuras nerviosas, por lo que los resultados aquí presentados están basados en el segundo de los experimentos realizados y se han resumido en la Figura 2. En dicho marcaje, se observaron claramente los axones marcados que ingresan en el lóbulo a través de los pequeños haces del nervio X (Figura 2: A y figura 3: A). Asimismo se observan una gran cantidad de procesos neuronales en el propio lóbulo vagal así como varios somas neuronales a niveles rostrales y caudales del punto de aplicación del trazador (Figura 2: B y figura 3:B). No se observaron conexiones caudales o rostrales fuera del lóbulo vagal, ni en el lóbulo facial ni en la región de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal.

Los experimentos realizados aplicando el trazador en el lóbulo vagal tras la aproximación caudal en encéfalos seccionados, dieron resultados similares mostrando que las principales conexiones aferentes del lóbulo vagal (LX) son los axones procedentes de las células ganglionares de la raíz sensitiva de los nervios IX-X. Además en estos experimentos se pudo observar que la fluorescencia se extendía rostralmente también en el lóbulo facial.

(LVII) y se marcaron numerosas fibras agrupadas en un tracto que se dispone de modo oblicuo y viaja paralelamente al tracto conocido como la raíz descendente del nervio trigémino a lo largo de la región ventrolateral del rombencéfalo. En algunos experimentos donde la aplicación de la carbocianina se realizó en niveles más caudales de la columna viscerosensorial se pudieron observar con mayor claridad fibras y células pertenecientes más posiblemente al lóbulo facial así como fibras marcadas en la raíz sensitiva del nervio facial (VII) (Figura 2: C y figura 3: C).

Hacia la parte más rostral del encéfalo la intensidad de la fluorescencia de la carbocianina va disminuyendo en las fibras del tracto gustatorio, sin embargo a la altura de la comisura en el tegmento dorsal, volvemos a encontrar varios axones marcados, no se ha localizado ninguna célula (Figura 2: D y figura 3: D).

Además de estos marcajes directamente relacionados con los centros gustativos primarios, también aparecieron marcados frecuentemente axones en la raíz descendente del nervio trigémino (V) tras su entrada a través de la raíz sensitiva del nervio así como componentes del área octavo-lateral (núcleo dorsal, intermedio, fascículo de Stieda), próximos al punto de aplicación del trazador, especialmente afectados en los encéfalos seccionados y que en muchos casos se circunscribe a las regiones próximas al lugar de marcaje. Todas las conexiones descritas fueron ipsilaterales.

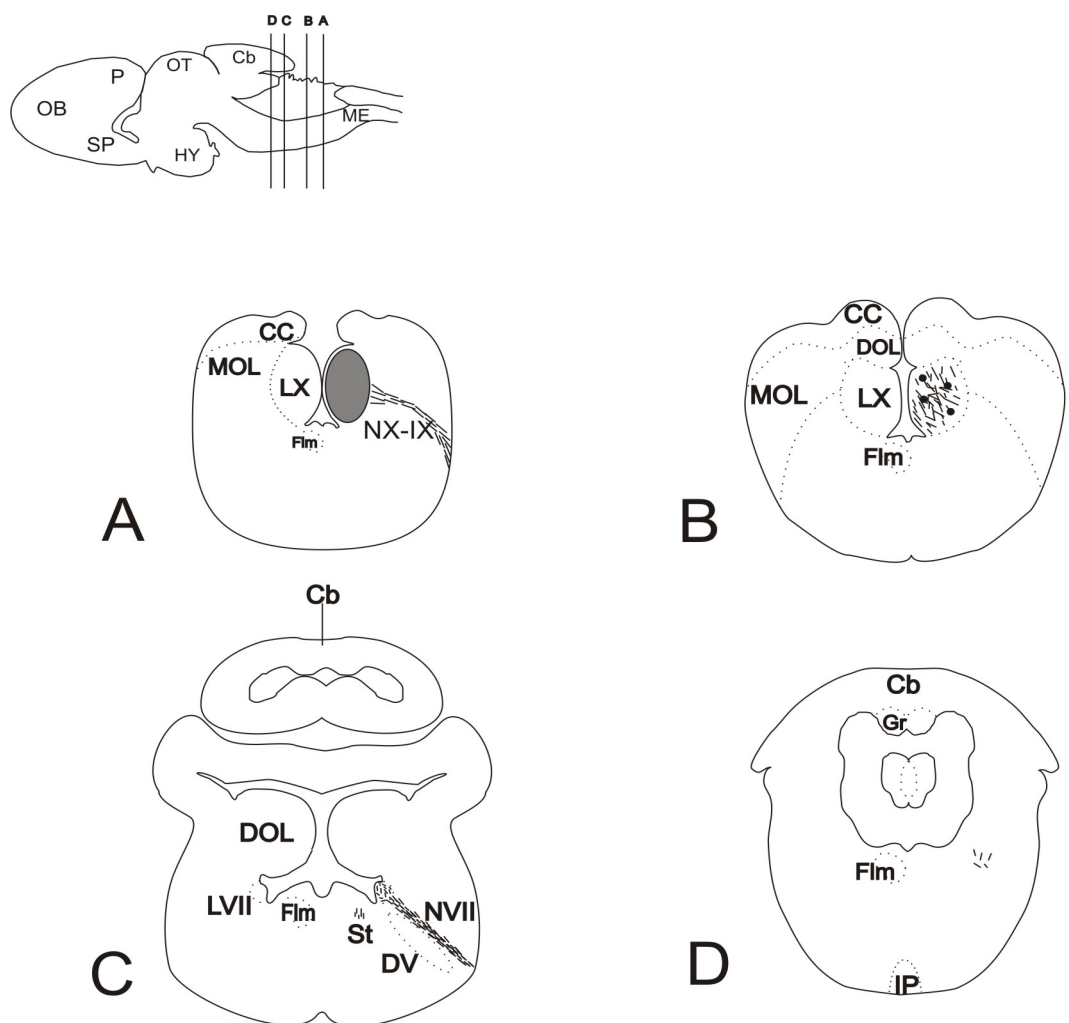


Figura 2: Representación esquemática de secciones transversales del encéfalo de *Scyliorhinus canicula* de caudal a rostral a los niveles indicados en el esquema de la parte superior, tras la aplicación del Dil en el LX (zona indicada con el círculo gris). Las células están representadas como círculos negros y las fibras como líneas cortas. Barra de escala: 500 μ m.

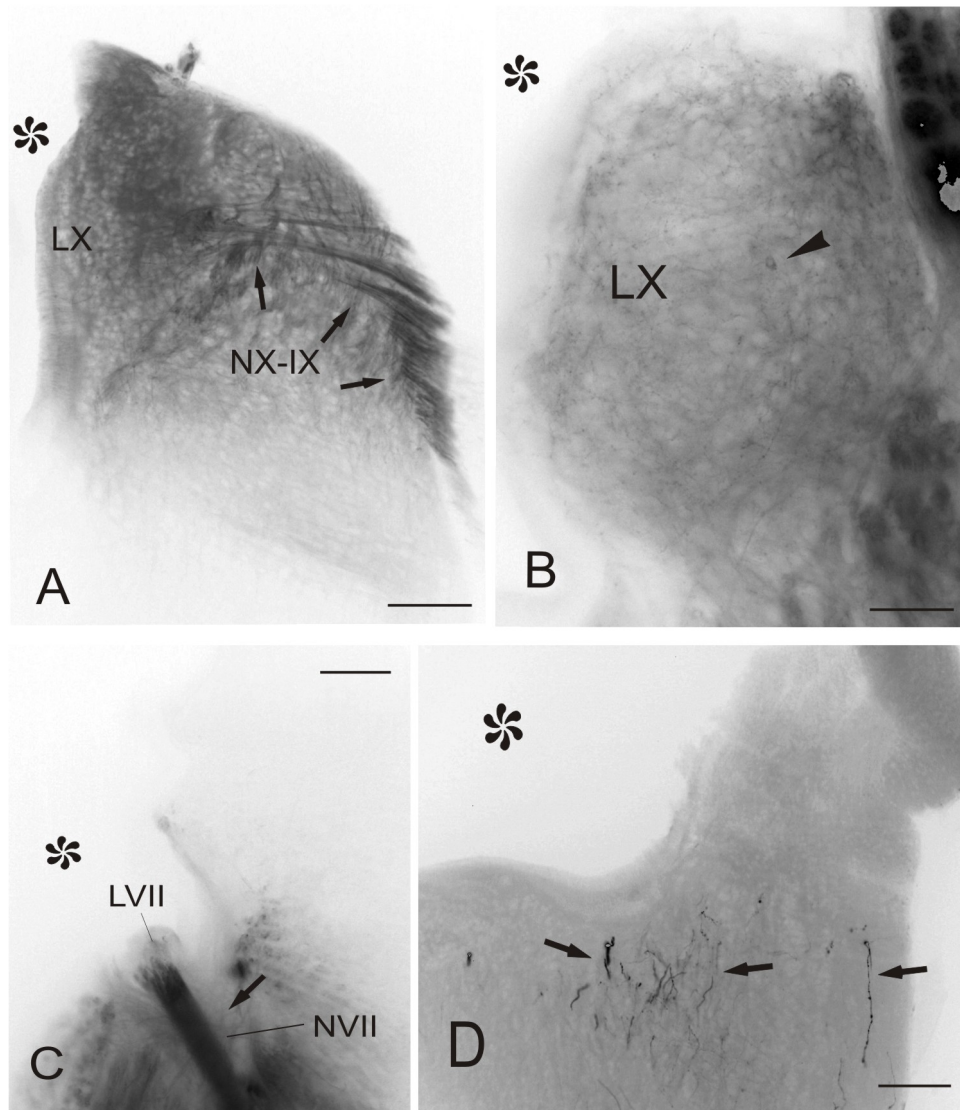


Figura 3: Fotomicrografías de secciones transversales desde niveles caudales a rostrales del encéfalo de *S. canicula*, donde se observan fibras (flechas) y cuerpos celulares (puntas de flechas) marcados tras la aplicación de la carbocianina en el lóbulo vago. Los asteriscos marcan los ventrículos. La fotografía **A** muestra la parte más caudal del encéfalo donde se ve el LX y las fibras aferentes del nX. La **B** muestra también el lóbulo del X pero en una sección más rostral en la que se ve como este ha aumentado de tamaño y una pequeña célula dentro de él. En la microfotografía **C** se observan el lóbulo facial y las fibras aferentes del nVII. En **D** se señalan fibras que destacan en la región del istmo-pretrigeminal. Barra de escala: 200 μ m (A, C y D) y 100 μ m (B).

Aplicación del Dil en el lóbulo hipotalámico

La carbocianina Dil fue depositada homolateralmente en el lóbulo hipotalámico de encéfalos *in toto* de tres ejemplares, en dos de los cuales se realizó adicionalmente un marcaje doble aplicando también DiO en el LX para observar su posible interrelación en el posible núcleo gustatorio secundario en la región ístmica, sin embargo la incorporación y difusión de éste último trazador por las membranas celulares que forman parte del LX fue prácticamente nula por lo que estos resultados no fueron concluyentes. No obstante, tras el marcaje con Dil en el lóbulo hipotalámico se observan gran cantidad de células y fibras marcadas, un grupo en la zona del tegmento mesencefálico ventrolateral (Figura 4: B y figura 5: D, E, F) y otro al nivel del istmo en el tegmento dorsal, lateralmente al velo medular anterior (Figura 4: C, D, E y figura 5: A, B, C). Si bien el marcaje es ipsilateral, pudieron observarse algunos axones marcados hacia el lado contralateral a través de una comisura dorsal conocida en elasmobranchios como el velo medular anterior (Figura 4: D). También se observaron conexiones con regiones rostrales del encéfalo (área preóptica, región pretectal, lóbulos telencefálicos) pero no se analizarán en este estudio, centrado en los centros gustativos primarios y secundarios. Los resultados de la aplicación del Dil en el lóbulo hipotalámico se han resumido en la Figura 4.

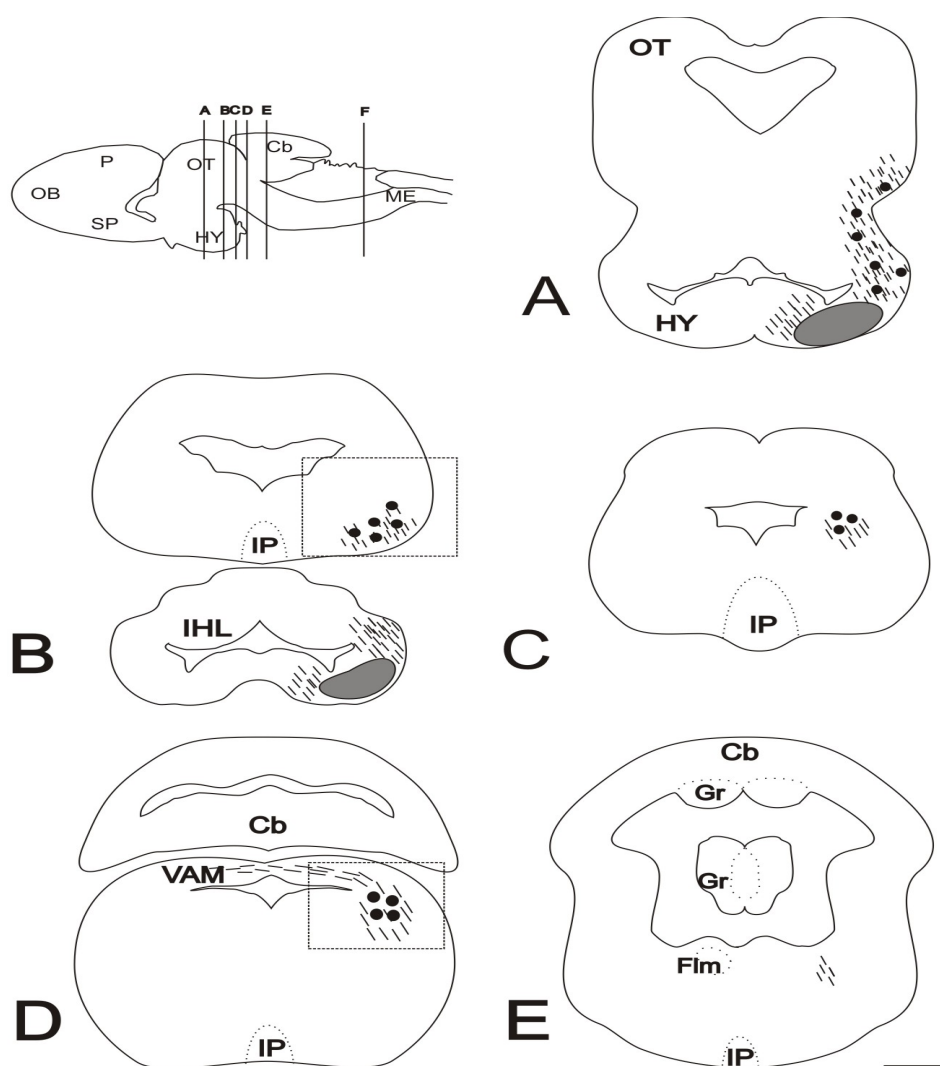


Figura 4: Representación esquemática de secciones transversales del encéfalo de *S. canicula* de rostral a caudal a los niveles indicados, mostrando las células (círculos negros) y

fibras (líneas cortas) marcadas al aplicar el Dil en el lóbulo hipotalámico (círculo gris). Las regiones rodeadas por los cuadrados representan las áreas aproximadas en las que se tomaron las microfotografías de la figura 5. Barra de escala: 500 μ m.

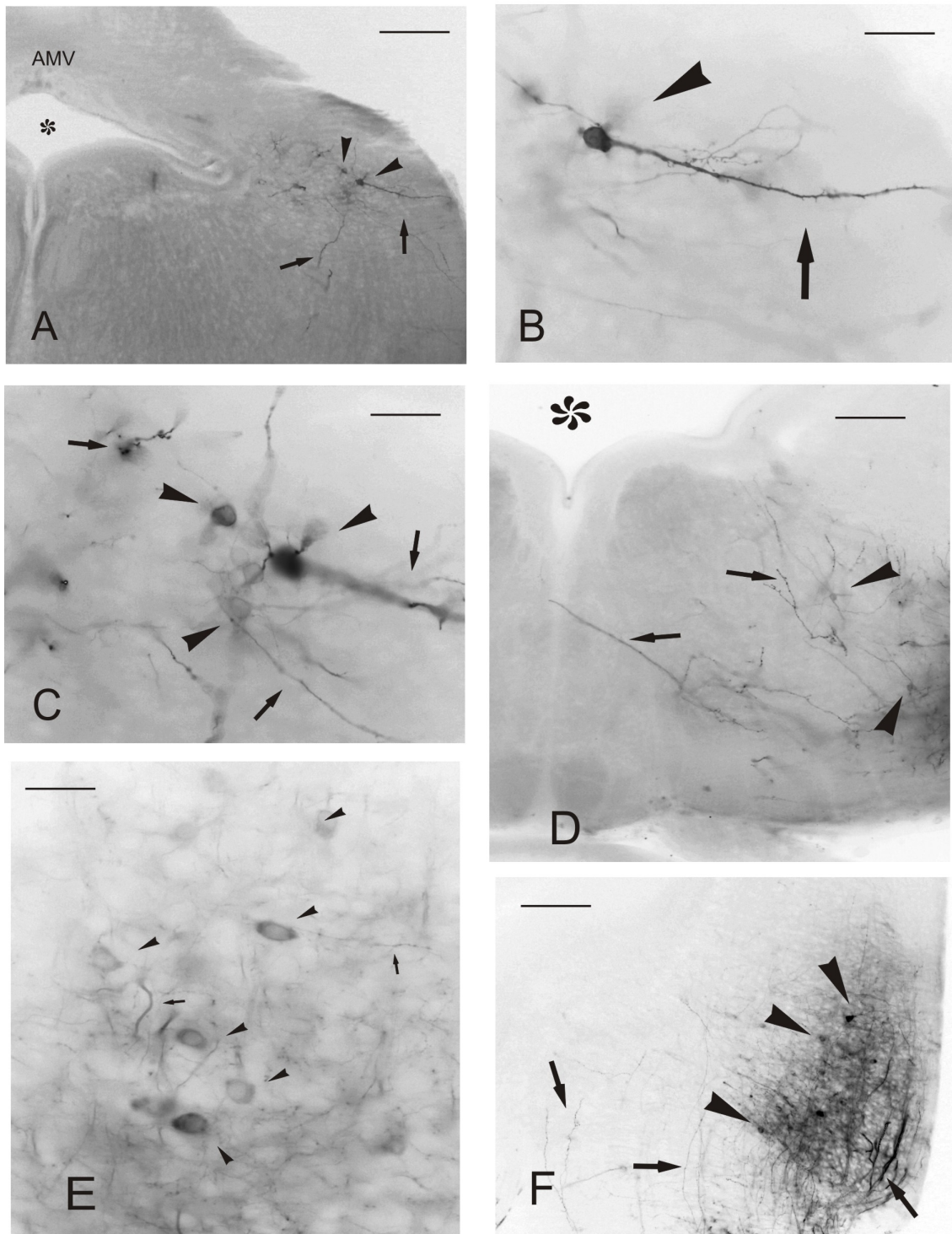


Figura 5: Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo de *S. canicula*, donde se observan fibras (flechas) y cuerpos celulares (puntas de flechas) marcados tras la

aplicación de la carbocianina en el lóbulo hipotalámico. Los asteriscos marcan los ventrículos. La flecha hueca señala dónde está el hipotálamo. La localización de las microfotografías se muestra en las áreas del recuadro de la figura 4. En la figura **A**, se observan las células y fibras de la zona dorsal del termento, en **B** y **C** vemos el detalle de las células y las fibras a más aumentos. En la figura **D** se muestran las células del tegmento ventrolateral y las fibras que se extienden hacia el ventrículo y la línea media, **E** y **F** muestran los cuerpos celulares en detalle. Barras de escala: 200 μm (A, D y F) y 50 μm (B, C y E).

Aplicación del Dil en la región tegmental dorsal del istmo

En un encéfalo seccionado desde la región anterior de uno de los ejemplares utilizados se aplicaron cristales de trazador la región dorsolateral del istmo al nivel del velo medular anterior (Figura 6: A) con la intención de marcar directamente la zona del núcleo gustatorio secundario antero-posteriormente, para observar las células aferentes tanto en el lóbulo visceral (IX-X,) como en el lóbulo facial (VII) para demostrar la existencia de conexiones entre estos núcleos primarios y el secundario.

El marcaje del núcleo de interés resultó muy parcial, incorporándose la mayor parte del trazador en el núcleo cerebeloso próximo, por lo que sólo se pudieron observar ocasionalmente algunas fibras que penetraban el lóbulo vagal ipsilateral (Figura 6: B) y ninguna en el lóbulo facial. Tampoco pudieron observarse células en la columna viscerosensorial

Parte de la carbocianina fue incorporada también por componentes del sistema sensorial del nervio trigémino (V) como la raíz descendente cuya posición es paralela al tracto gustatorio secundario y a la columna viscerosensorial .

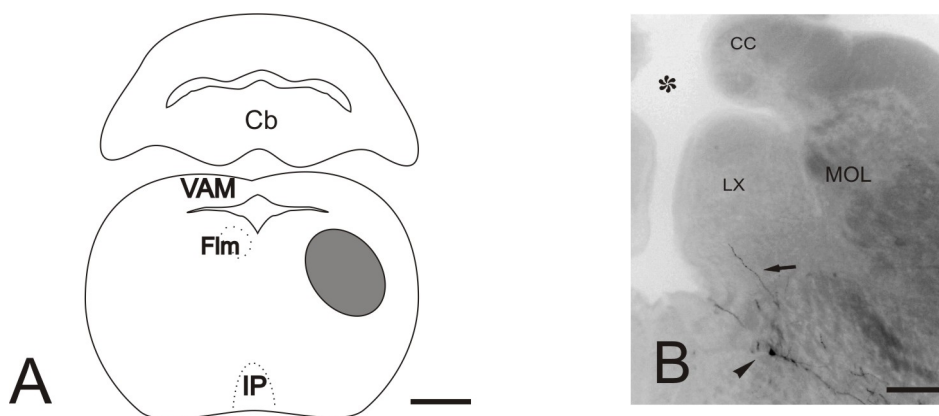


Figura 6: La imagen **A** es una representación esquemática de la sección transversal en la que se realizó el marcaje con Dil en el supuesto NGS (círculo gris). La **B** es una fotomicrografía en la que se observan una célula y varias fibras entrando en el LX, los únicos elementos del sistema gustativo teñidos tras este marcaje. Barra de escala: 500 μm (A) y 200 μm (B).

ABREVIATURAS

Cb:	cerebelo	CC:	cresta cerebelar.
DV:	raíz descendente del trigémino (V).	Flm:	fascículo medial longitudinal.
Gr:	capa granulosa cerebelar.	HY:	hipotálamo.
IP:	núcleo interpeduncular.	LVII:	lóbulo facial.
LX:	lóbulo vagal.	ME:	médula espinal.
MOL:	núcleo medial octavolateral.	nIX-X:	nervios vago y glosofaríngeo (IX-X).
nVII:	nervio facial (VII).	OB:	bulbo olfativo.
OT:	techo óptico.	P:	palium.
SP:	subpalium.	St:	fascículo de Stieda.
VAM:	velo medular anterior.		

Tabla 2: Abreviaturas utilizadas.

5. DISCUSIÓN

Los centros de integración primaria del sistema gustativo y sus conexiones han sido estudiados principalmente en ciprínidos e ictalúridos (Clemente et al. 2005; Finger y Morita 1985; Kanwal y Finger, 1992; Kato et al., 2012; Morita et al., 1980), en los que este sistema está muy desarrollado, sin embargo prácticamente no existe información alguna sobre estos circuitos en elasmobranquios.

En el presente estudio se han utilizado para observar las conexiones del sistema gustativo en condríctios, trazadores neuronales que se integran en las membranas de las células del sistema nervioso. Las carbocianinas son trazadores muy eficientes debido a que son muy sensibles y permiten marcar, *in vivo*, pero también en tejidos previamente fijados, las conexiones de centros neuronales de tamaño reducido o de difícil acceso bajo inspección visual; sin embargo, también pueden presentar una serie de problemas compartidos por otros trazadores neuronales y asociados a la difusión/incorporación del mismo (como el posible marcaje de axones al paso o la difusión del trazador a áreas adyacentes) y otros propios de las carbocianinas (incorporación en células gliales, vainas de mielina), por lo que los resultados obtenidos con estas metodologías en el sistema nervioso siempre deben ser interpretados con precaución. En primer lugar, a pesar de aplicarse en forma de cristal insoluble sobre una superficie concreta, en periodos de incubación largos, las moléculas lipofílicas pueden difundir a las áreas vecinas resultando en un marcaje poco específico. Las regiones cercanas al punto de marcaje suelen adquirir una cierta fluorescencia dificultando

el análisis de las posibles conexiones con áreas inmediatamente adyacentes. Una posible solución a este problema consiste en optimizar los tiempos de incubación mediante repeticiones experimentales (Folgueira et al., 2004).

Por otra parte el Dil difunde tanto retrógrada como anterógradamente en las fibras que surgen o pasan por el punto de marcaje por lo que puede ser difícil determinar su origen. Estos problemas son comunes a otros trazadores neuronales como HRP o dextranaminas y pueden solucionarse parcialmente realizando marcajes recíprocos en los supuestos destinos de las fibras (Folgueira et al., 2004). Un problema añadido es que si la perfusión no se realiza adecuadamente, las células sanguíneas remanentes que presentan ciertos niveles de autofluorescencia pueden dificultar la identificación de células y campos terminales marcados (Folgueira et al., 2004).

Además en sistemas muy mielinizados las carbocianinas se incorporan masivamente a las vainas de membrana que rodean a los axones mielínicos pudiendo dificultar su incorporación en la membrana del axón, de modo que el trazador no difunde de forma eficiente y puede generar falsos negativos (por ejemplo no detectando los campos terminales o reduciendo considerablemente la cantidad de trazador necesario para revelar los somas) (Folgueira et al., 2004). Principalmente por esta razón se han utilizado ejemplares juveniles de *Scyliorhinus* que, a pesar de tener una morfología encefálica externa ligeramente diferente a la de los adultos por no estar totalmente desarrollados y de la dificultad que supone trabajar con individuos tan pequeños, presentan un menor grado de mielinización. Sin embargo, pese a esta precaución, la mayor parte de los sistemas neurales ascendentes y descendentes que se distribuyen por el rombencéfalo, donde se encuentran los centros gustativos primarios aparecen ya bastante mielinizados desde una temprana edad.

En los primeros experimentos realizados para la elaboración de este estudio se utilizó en la solución fijadora una formulación de PB tradicionalmente utilizada para elasmobranchios y caracterizada por estar suplementada con urea (1%) con el fin de ajustar la osmolaridad. Esta formulación para la solución fijadora resultó inocua mientras los encéfalos se mantuvieron en frío o a temperatura ambiente. Sin embargo, al ser sometidos durante la incubación a una temperatura de 37° a lo largo de varios días, se formaron tanto en la superficie como en el interior del tejido nervioso una gran cantidad de microcristales esféricos de naturaleza salina que dificultaron el proceso de seccionado del encéfalo e imposibilitaron la incorporación del trazador y la visualización de las estructuras nerviosas, inutilizando casi por completo el experimento. Identificado el problema se optó por evitar la presencia de urea en la solución fijadora. No se apreciaron cambios en la estructura del tejido y la calidad y eficiencia del transporte aparentemente no se ve afectado (Yáñez et al., 2011).

En estudios previos se ha probado que la información quimiosensorial correspondiente al sistema gustativo entra en el encéfalo de *Scyliorhinus canicula* por el rombencéfalo mediante los nervios X, IX y VII, que se incorporan con fibras aferentes a la columna viscerosensorial, una protrusión de la pared lateral del cuarto ventrículo. Esta es considerada el centro primario de integración de la información gustativa. En condríctios, el área viscerosensorial no parece estar subdividida en núcleos separados especializados en la integración del gusto o de la sensibilidad visceral general (Smeets, 1998). Esta organización se parece más a aquella descrita en truchas, una especie generalista en lo que se refiere al sentido gustativo y en la que el sistema gustatorio se organiza en una columna viscerosensorial continua (Folgueira et al., 2003) a diferencia del esquema de organización

de ciprínidos e ictalúridos en la que la columna viscerosensorial se divide en diferentes lóbulos hipertrofiados (Kanwal & Finger, 1992; Morita & Finger 1987; Kato et al., 2011). En cualquier caso, en pintarroja se ha observado que a diferencia del discreto lóbulo facial, el lóbulo visceral, que recibe las fibras aferentes de los nervios glosofaríngeo y vago, que llevan información del área intraoral del animal, es una estructura relativamente grande en individuos juveniles, protruyendo con claridad hacia el IV ventrículo por lo que cabría esperar que tuviese alguna eferencia hacia un centro secundario al igual que ocurre en teleósteos, en los que los centros gustativos primarios proyectan a núcleos situados en el diencefalo y de allí al telencefalo mediante múltiples rutas (Kanwal & Finger, 1992).

Tras la aplicación del Dil en la columna viscerosensorial a nivel del lóbulo vagal, se marcaron numerosas fibras agrupadas en un tracto dispuesto de modo oblicuo y que aparentemente viaja paralelo a la raíz descendente del nervio trigémino y que podría corresponderse con el tracto gustatorio secundario presente en el resto de los vertebrados. Nuestros resultados muestran además que el nervio trigémino también apareció marcado con cierta regularidad, lo que sugiere que o bien cierta información somatosensorial que entra a través del trigémino podría alcanzar la columna viscerosensorial o bien se trata de un problema artefactual de la técnica por contaminación de la raíz descendente del trigémino por difusión desde el área de aplicación del trazador o por marcaje transneruonal desde los axones del tracto gustatorio secundario al tracto descendente del trigémino. En estudios previos no se han encontrado fibras aferentes al lóbulo del glosofaríngeo o al vago que entren por el nervio trigémino o viajen por el tracto descendente del trigémino a lo largo de la región ventrolateral del rombencéfalo (Smeets, 1998), pero sí se describen en mamíferos aferencias somatosensoriales en la región viscerosensorial (Purves et al. 2004). El tracto gustatorio antes mencionado que aparece marcado en nuestros experimentos parece terminar en un grupo de células al nivel del istmo pretrigeminal en el tegmento dorsal y parece corresponderse con las encontradas tras el marcaje del lóbulo hipotalámico por lo que podría ser el núcleo o complejo gustatorio/visceral secundario.

Este núcleo gustatorio secundario no se ha ubicado en ningún atlas hasta ahora, sin embargo, Smeets y Timerik (1981) describen en *Raja clavata* un grupo de neuronas pequeñas que proyectan hacia la médula espinal situadas en el tegmento ventrolateral al nivel del istmo, que denominaron núcleo F. Asimismo describen en adultos de *Scyliorhinus canicula* un núcleo con estas mismas características adyacente al núcleo F, al que se referirán como núcleo G. Posteriormente, Smeets (1998) demuestra que en *Raja eglanteria* el núcleo F envía fibras ipsilaterales ascendentes al lóbulo hipotalámico inferior. Estudios inmunohistoquímicos posteriores de Anadón et al. (2000) establecieron que estas neuronas son ChAT-positivas, es decir, son neuronas colinérgicas, al igual que las células del núcleo gustatorio secundario de teleósteos como la trucha (Pérez et al., 2000), el pez cebra (Mueller et al., 2004), y la tenca (Clemente et al., 2005).

El grupo de células y fibras encontradas a nivel del istmo pretrigeminal en el tegmento dorsal parece coincidir tanto en morfología como en conexiones con el descrito por todos estos autores como núcleo G o F, siendo imposible hacer una clara distinción entre ellos. Se observó también que algunos axones de estas células cruzaban al lado contralateral por una comisura dorsal conocida en condríctios como el velo medular anterior. En teleósteos los núcleos gustatorios secundarios están conectados mediante la comisura gustativa del istmo (Kato et al. 2012). lo que podría indicar que el núcleo G sería el núcleo gustatorio secundario de los elasmobranquios. Por otra parte se ha demostrado que en algunos teleósteos como *Danio rerio* (Mueller et al., 2004) o *Carassius auratus* (Kato et al., 2012) existe una

regionalización topográfica del SGN de modo que las regiones medial, intermedia y lateral reciben las fibras de los lóbulos vagal, glossofaríngeo y facial respectivamente que no hemos podido observar en *S.canicula*. En estos peces el NGS proyecta hacia centros terciarios como el toro lateral, el lóbulo hipotalámico inferior y el núcleo talámico posterior, se ha observado que en *S. canicula* el núcleo G conecta con el lóbulo hipotalámico pero nada se sabe de los otros dos centros, por lo que sería necesario un estudio pormenorizado en el que se realizasen nuevos marcajes en el NGS, en los centros primarios y en el toro lateral y el equivalente en elasmobranquios del núcleo talámico posterior para comprobar estas conexiones.

En resumen, nuestros resultados indican que axones procedentes de los centros gustatorio-visceroles primarios ascienden por el tracto gustatorio secundario y terminan al nivel del istmo donde se ubicaría el núcleo gustatorio secundario (NGS).

Por tanto, exista o no núcleo secundario en elasmobranquios parece que el sistema gustativo de estos animales es bastante reducido en comparación con el de otros peces. Esto podría tener una serie de implicaciones biológicas; en primer lugar, la ausencia de centros de integración de la información gustativa más allá de los centros primarios puede sugerir que dicha información no es integrada en niveles encefálicos superiores por lo que mayoritariamente sería procesada en relación con sistemas de reflejos sensori-motores. Por otra parte la hipertrofia del lóbulo facial de los ictalúridos está correlacionada con el uso del sistema gustativo extraoral para la localización de comida (Kanwal & Finger, 1992). Sin embargo los elasmobranquios son ampliamente conocidos por su sistema olfativo altamente desarrollado que utilizan con este mismo fin y que se ve reflejado en el gran desarrollo del epitelio y bulbos olfativos (Yáñez et al., 2011) por tanto es posible que la información quimiosensorial que reciben gracias al olfato sea suficiente para la búsqueda de sus presas lo que podría estar correlacionado con la reducción del sistema gustativo extraoral para tal fin.

6. CONCLUSIÓN / CONCLUSIONS

Conclusión

- En elasmobranquios los centros primarios de integración de la información gustativa se organizan en una columna viscerosensorial continua, más desarrollada por la zona caudal (vagal) y más reducida por la rostral (facial).
- Se ha identificado en la región del istmo un posible núcleo gustatorio secundario, que recibe aferencias de los centros primarios y proyecta hacia el hipotálamo.
- Con la metodología presentada, la suplementación del líquido fijador (paraformaldehído 4%) con urea puede originar la formación de microcristales salinos que dificultarán la visualización de los resultados.

Conclusion

- In elasmobranchs, the gustatory primary centers are organized in a continuous visceral sensory column which is more developed in its caudal end (vagal) than in its rostral end (facial).
- A putative secondary gustatory nucleus has been identified at the isthmal area, that receives afferent projections from the primary centres and projects to the hypothalamus.
- The additional use of urea in the paraformaldehyde (4%) solution using the present methodological procedure leads to the generation of saline microcrystals that will damage the experiment.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Aquarium Finisterrae de A Coruña el habernos proporcionarnos los ejemplares utilizados en los experimentos y al Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña el haberme dejado utilizar sus instalaciones para realizar este trabajo, mención especial para Julián Yáñez Sánchez, el director de este proyecto, por la paciencia que ha demostrado durante la elaboración y corrección de este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anadón R, Molist P, Rodríguez-Moldes I, López JM, Quintela I, Cerviño MC, Barja P, González A. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of an elasmobranch, the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). J Comp Neurol. 2000; 420: 139-170.
- Barreiro-Iglesias A, Anadón R, Rodicio MC. The gustatory system of lampreys. Brain, Behav Evol. 2010; 75: 241-250.
- Butler AB, Hodos W. Sensory cranial nerves of the brainstem. En: Comparative Vertebrate Neuroanatomy. 2ª ed. John Wiley & Sons, Inc. 2005; p. 183–204.
- Clemente D, Arenza FJ, Sánchez-González R, Porteros A, Aijón J, Arévalo R. Comparative analysis of the distribution of choline acetyltransferase in the central nervous system of cyprinids. Brain Res Bull. 2005; 66: 546-549.

- Ellis J, Mancusi C, Serena F, Haka F, Guallart J, Ungaro N, Coelho R, Schembri T, MacKenzie K (2009). *Scyliorhinus canicula* [Internet]. The IUCN Red List of Threatened Species. Cambridge: IUCN; 2015 [citado el 2015 Abr 28]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/161399/0>.
- Finger TE, Morita Y. Two gustatory systems: facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science*. 1985; 227: 776-778.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez, J. Experimental study of the connections of the gustatory system in the rainbow trout, *Onkorhynchus mykiss*. *J Comp Neurol*. 2003; 465: 604-619.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I: olfactory bulb and ventral area. *J Comp Neurol*. 2004; 480: 180-203.
- Hamlett WC. *Sharks, skates, and rays*. Maryland: The Johns Hopkins University Press. 1999.
- Hart NS, Collin SP. Shark senses and shark repellents. *Integr Zool*. 2015; 10: 38-64.
- Kanwal JS, Finger TE. Central Representation and Projections of Gustatory Systems. En: Hara TJ, editor. *Fish Chemoreception*. Cambridge: Chapman & Hall; 1992; p.79-101.
- Kato T, Yamada Y, Yamamoto N. Ascending gustatory pathways to the telencephalon in goldfish. *J Comp Neurol*. 2012; 520: 2475-2499.
- Kato T, Yamada Y, Yamamoto N. General visceral and gustatory connections of the posterior thalamic nucleus of goldfish. *J Comp Neurol*. 2011; 519: 3102-3123.
- Kirino M, Parnes J, Hansen A, Kiyohara S, Finger TE. Evolutionary origins of taste buds: phylogenetic analysis of purinergic neurotransmission in epithelial chemosensors. *Open Biol*. 2013; 3: 130015.
- Morita Y, Finger TE. Topographic representation of the sensory and motor roots of the vagus nerve in the medulla of goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol*. 1987; 264: 231-249.
- Morita Y, Ito H, Masai H. Central gustatory paths in the crucian carp, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol*. 1980; 191: 119-132.

- Mueller T, Vernier F, Wullimann MF. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. Brain res. 2004; 1011: 156-169.
- Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez- Moldes I. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and tract-tracing observations on the connection of the nuclei of the isthmus. J Comp Neurol. 2004; 428: 450-474.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, Mcnamara JO, Williams, S. Sentidos químicos. En: Neurociencia. 3ª ed. Panamericana. 2004; p. 369-407.
- Smeets WJAJ. Cartilaginous fishes. En: Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar H J, Nicholson C, editors. The Central Nervous System of Vertebrates. Berlin: Springer. 1998; p. 551-646.
- Smeets WJAJ, Timerik SJB. Cells of origin of pathways descending to the spinal cord in two chondrichtians, the shark *Scyliorhinus canicula* and the ray *Raja clavata*. J Comp Neurol. 1981; 202: 473-491.
- Wullimann MF. The central nervous system. En: Evans DH, Claiborne JB, Currie S , editors. The Physiology of Fishes. New York: CRC Press. 1998; p. 245-282.
- Yáñez J, Folgueira M, Köhler E, Martínez C, Anadón R. Connections of the terminal nerve and the olfactory system in two galeomorph sharks: an experimental study using carbocyanine dye. J Comp Neurol. 2011; 519: 3202-3217.

